

University of Groningen

Infrared spectroscopy in clinical chemistry, using chemometric calibration techniques

Volmer, Marcel

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Volmer, M. (2001). *Infrared spectroscopy in clinical chemistry, using chemometric calibration techniques*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Opzet van dit proefschrift was het verder ontwikkelen van methodes voor de bepaling van vet in feces en het vaststellen van de samenstelling van urinewegstenen. De ontwikkeling bestond voornamelijk uit het onderzoeken van de toepasbaarheid van nieuwe infrarood spectroscopische methodes en het gebruiken van chemometrische technieken voor het kwantificeren van de resultaten. Verder is er informatie gegeven over de pathofysiologische achtergrond van de onderzochte studies.

De kwaliteit van enkele traditionele klinisch chemische analyse methoden laat te wensen over. Om deze reden hebben wij ons bezig gehouden met de ontwikkeling van nieuwe methodes voor de analyse van vet in feces en het vaststellen van de samenstelling van nierstenen. Voor de in dit proefschrift beschreven methodes werd gebruik gemaakt van infrarood spectroscopie voor het bepalen van de componenten in het patiëntenmateriaal. Om de bewerkelijkheid van de methode zo klein mogelijk te houden zijn de metingen zo veel mogelijk direct uitgevoerd in het onbewerkte patiënten materiaal. Het nadeel van deze aanpak is dat de vaststelling van de gehaltes van de componenten bemoeilijkt wordt door de aanwezigheid van storende (interfererende) componenten in het materiaal. Om het probleem van de interfererende componenten op te lossen is gebruik gemaakt van chemometrische technieken voor het vaststellen van de gehaltes van de gewenste componenten. Hierbij is meestal gebruik gemaakt van multivariate calibratie methoden, zoals partial least-squares (PLS) regressie en kunstmatige neurale netwerken.

De **Introductie** beschrijft de pathofysiologische achtergrond, de analytisch chemische methodieken en enkele postanalytische kwantificering methoden, met als doel om meer inzicht te verschaffen in de analyse van vet in feces en het vaststellen van de samenstelling van nierstenen. De introductie beschrijft naast de gebruikte analytische methodes ook enkele daaraan gerelateerde referentie methodes. De interpretatie van de resultaten van sommige analytische methoden in het klinisch chemische laboratorium is in veel gevallen complexer geworden. Dit wordt bijvoorbeeld veroorzaakt door het feit dat er een toenemende behoefte bestaat om de gehaltes van de stoffen in het onbewerkte monstermateriaal te meten. Dit heeft onder andere weer geleid tot de ontwikkeling van de zogenaamde chemometrische methoden in de afgelopen decennia. Voor onze studies hebben wij gebruik gemaakt van chemometrische technieken en wel in het bijzonder voor de multivariate kalibratie van onze spectrale meetgegevens. Voor de multivariate kalibratie maakten wij gebruik van kunstmatige neurale netwerken en 'partial least-squares' regressie.

Deel 1 beschrijft de ontwikkeling van enkele moderne analyse methodes voor de bepaling van vet in feces. De analyse van vet in feces is van belang voor de vaststelling van de diagnose van steatorrhoea. Steatorrhoea is een aandoening waarbij het via de voeding genuttigde vet slecht wordt verteerd, of slecht wordt geabsorbeerd in de dunne darm, wat vervolgens leidt tot een verhoogde uitscheiding van vet in de feces. Er werd gebruik gemaakt van infrarood spectroscopie en er werd een nieuwe referentie methode ontwikkeld. Verder werd er een snelle methode voor de analyse van fecaal vet bestudeerd.

Hoofdstuk 1 beschrijft de ontwikkeling van een nieuwe methode voor de analyse van vet in feces. Aanleiding van dit onderzoek was de bevinding dat de resultaten van 28 patiënten monsters, waarvan het vet in feces was gemeten met de traditionele titrimetrische Van de Kamer methode in een drietal Academische Ziekenhuizen, niet goed overeenkwamen. Met de nieuwe methode werden de vetzuren geëxtraheerd uit de feces met behulp van een

aangezuurd mengsel van petroleum ether-ethanol. Na extractie werd de petroleum ether laag gedroogd en werden de vetzuren opgelost in chloroform. Na overbrengen van de chloroform in een transmissie cel, werd een infrarood spectrum opgenomen in het golflengte gebied van $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$. Voor de calibratie werd gebruik gemaakt van standaard mengsels met oplopende concentraties en bestaande uit de vetzuren stearinezuur en palmitinezuur (65:35). De CH_2 infrarood absorptie band bij 2855 cm^{-1} werd gebruikt voor de kwantificering. De vergelijking tussen de met de Van de Kamer en de middels infrarood spectroscopie verkregen resultaten van 97 patiënten in één van de academische centra gaf een correlatie te zien van $r=0.96$ ($y=1.12x - 0.02$, standaard schattingsfout 0.89 g%). Er werd geen significant verschil gevonden wanneer de infrarood resultaten van de 28 patiënten samples werd vergeleken tussen drie academische ziekenhuis laboratoria. De nieuwe methode is eenvoudig en snel uit te voeren en heeft voldoende intra- en interlaboratorium precisie om gebruikt te kunnen worden voor de diagnose van steatorrhoea.

Hoofdstuk 2 beschrijft een verdere verbetering van de in hoofdstuk 1 beschreven methode. Deze methode beschreef de extractie met petroleum ether-ethanol, waarna de vetzuren werden heropgelost in chloroform na drogen. Deze methode is nog steeds tamelijk tijdrovend en werd vervangen door een enkelvoudige chloroform extractie van het feces monster. De resultaten van 111 patiënten monsters werden geanalyseerd met de verbeterde extractie methode en geëvalueerd door deze te vergelijken met de resultaten van dezelfde monsters die geëxtraheerd waren met de petroleum ether-ethanol methode. De resultaten van beide methodes vertoonden een goede mate van overeenstemming ($r=0.991$, $y=1.055+0.24$ en een standaard schattingsfout van $0.365\text{ g}\%$). De nieuwe vereenvoudigde extractie procedure voor de analyse van vet in feces geeft een aanzienlijke besparing in tijd, chemicaliën en te gebruiken apparatuur.

In *hoofdstuk 3* werd de toepasbaarheid van de analyse van vet in feces middels een mid-infrarood (MIR) spectroscopische methode bestudeerd, waarbij gebruik gemaakt werd van een zogenaamd ‘attenuated total reflection’ (ATR) accessoire. Verder werd de toepassing van een nieuwe ‘nabij-infrarood’ (NIR) spectroscopische methode onderzocht. Bij de NIR methode werden dichtgelaste plastic zakjes, met daarin het patiënten materiaal, gebruikt als transmissie cellen. Voor de standaardisatie werd gebruik gemaakt van de in hoofdstuk 2 beschreven infrarood methode als referentie methode. Bij beide nieuwe methodes werd gebruik gemaakt van partial least-squares regressie voor de calibratie. Helaas vertoonde 15% van de patiënten monsters, geanalyseerd met de ATR methode, te grote afwijkingen als deze vergeleken werden met de resultaten van de referentie analyse. De standaard schattingsfout van de NIR methode was $1.1\text{ g}\%$. Geconcludeerd werd dat de nieuwe NIR methode een veelbelovende techniek is voor het routinematig analyseren van vet in onbewerkte feces. Aanvullende experimenten zijn echter nodig en de methode moet nog gevalideerd worden met een externe (onafhankelijke) validatie set, met bij voorkeur triplo metingen van ieder monster.

Deel II beschrijft de ontwikkeling van postanalytische methoden voor de analyse van de samenstelling van urineweg stenen. De mensheid wordt al eeuwenlang geteisterd door urinewegstenen. Een bekend probleem van urinewegstenen is dat ze de neiging hebben om

terug te komen na verloop van tijd. Daarom is het van belang om de juiste samenstelling van de urinewegstenen vast te kunnen stellen voor een adequate behandeling van de patiënt en wel in het bijzonder om herhaling van urinewegsteenvorming te voorkomen. In het verleden werd de analyse veelal uitgevoerd door middel van natchemische analyse. Deze methode is echter niet erg juist en reproduceerbaar. De laatste jaren is deze methode in veel laboratoria vervangen door een infrarood spectroscopische analyse. De interpretatie van de spectra van urinewegstenen is echter niet altijd even eenvoudig. Daarom hebben wij postanalytische methodes ontwikkeld met behulp van enkele chemometrische technieken om het vaststellen van de kwantitatieve samenstelling van de urinewegstenen te vergemakkelijken. Verder hebben wij gekeken naar de mogelijkheid van een verdere optimalisatie van de infrarood spectroscopische analyse.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van een postanalytische methode voor het vaststellen van de samenstelling van de drie meest voorkomende componenten, whewelliet, weddelliet en carbonaat apatiet, in urinewegstenen. De methode was gebaseerd op PLS regressie van spectra die waren opgenomen met behulp van KBr transmissie tabletten in het midden-infrarood gebied ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). De calibratie set van de PLS regressie bestond uit 25 synthetische mengsels van whewelliet, weddelliet en carbonaat apatiet, ieder met een verschillende relatieve samenstelling. De waarde van de PLS methode werd geëvalueerd door het analyseren van een afzonderlijke set met synthetische mengsels en met een set geselecteerde patiënten monsters waarvan de samenstelling werd vastgesteld via computer 'library search' gevolgd door een visuele beoordeling van de spectrale band intensiteiten voor een meer exacte vaststelling van de samenstelling. De library search werd uitgevoerd door verschillende bibliotheken te doorzoeken, met daarin 235 referentie spectra met verschillende kwalitatieve samenstellingen en in verschillende verhoudingen. Vergeleken met deze methode werd PLS regressie beter bevonden met betrekking tot zowel de juistheid van de uitslag als de vereiste noodzaak van expert kennis. Er werd geconcludeerd dat PLS regressie goed bruikbaar was als postanalytische methode voor routinematige kwantificering van de samenstelling van urinewegstenen, niet alleen voor whewelliet, weddelliet en carbonaat apatiet, maar ook voor andere samenstellingen van urinewegstenen.

Hoofdstuk 5. In het voorgaande hoofdstuk was reeds beschreven dat library search doorgaans gevolgd moet worden door een visuele interpretatie van de band intensiteiten voor het vaststellen van de juiste samenstelling van de urinewegstenen. Om de noodzaak van deze laatste stap te minimaliseren werd een kunstmatig neurale netwerk model ontwikkeld en uitgetest voor het vaststellen van de samenstelling van de urinewegstenen. Er werden verschillende monsters gemaakt voor de training set door het bereiden van binaire en ternaire mengsels bestaande uit ammonium waterstofuraat, brushiet, carbonaat apatiet, cystine, struviet, urinezuur, weddelliet en whewelliet. Daarnaast werd er een aantal kunstmatige mengsels geanalyseerd voor evaluatie, evenals een aantal geselecteerde patiënten monsters, waarvan de samenstelling vooraf was vastgesteld met behulp van library search gevolgd door een visuele interpretatie van de spectra. De resultaten van de neurale netwerk analyse werd meer juist bevonden dan die van library search en bovendien bleek de expertkennis, nodig voor het beoordelen van de spectrale bandintensiteiten, vrijwel nooit noodzakelijk. Er werd geconcludeerd dat neurale netwerken goed gebruikt kunnen worden voor het routinematige analyseren van de samenstelling van urinewegstenen.

Hoofdstuk 6 beschrijft de ontwikkeling van een nieuwe infrarood methode voor de analyse van urinewegstenen. Hierbij werd gebruik gemaakt van een zogenaamde ‘Golden Gate monsterhouder die uitgevoerd was met enkelvoudige reflectie ATR en geschikt is voor het analyseren van zeer kleine hoeveelheden monstermateriaal. De infrarood meting werd uitgevoerd na het aanbrengen en onder druk brengen van 1 tot 2 mg zorgvuldig vermalen monster op het vlakke oppervlak van het diamant kristal. Deze methode was een vervanging van de gebruikelijke methode, die gebruikt maakt van KBr tabletten. Aanleiding voor de ontwikkeling van de nieuwe methode was het feit dat de bereiding van KBr tabletten, zoals beschreven in hoofdstuk 4 en 5, tamelijk tijdrovend was en bovendien bleken de tabletten tamelijk gevoelig voor breuk. Voor het vaststellen van de samenstelling van de urinewegstenen werd gebruik gemaakt van achtereenvolgens library search en een kunstmatig neurale netwerk model. De bibliotheek bestond uit referentiespectra van 25 zuivere stoffen en 236 binaire en ternaire mengsels van de acht meest voorkomende componenten in nierstenen. Het netwerk werd getraind en gevalideerd met 248 soortgelijke mengsels en vervolgens getest met 92 patiënten monsters. De totale fout van het optimaal getrainde netwerk model was respectievelijk 1.5% en 2.3% voor de training en de validatie set. Verder werden nog 14 expert regels beschreven om kleine afwijkingen van de neurale netwerk uitkomst te corrigeren. De resultaten van de 92 patiënten monsters werden vergeleken met de resultaten van spectra geanalyseerd met de KBr methode. De samenstelling van de KBr spectra werd vastgesteld aan de hand van library search, gevolgd door een visuele beoordeling van de spectra. Door gebruik te maken van Altman en Bland grafieken werd alleen een significante afwijking tussen de resultaten van beide methodes gevonden voor brushiet (-0.8%) en het gelijktijdig voorkomende whewelliet (-2.8%) en weddeliet (3.8%). De gemiddelde afwijking van alle resultaten was 9%. Geconcludeerd werd, dat de Golden Gate methode de voorkeur verdiende boven de KBr methode, vanwege de kleine hoeveelheid benodigd monster, de gebruikersvriendelijkheid, de robuustheid en de snelheid van de analyse. Hoewel de benodigde hoeveelheid expert kennis kleiner was dan bij gebruik van uitsluitend library search, werd toch geconcludeerd dat enige visuele interpretatie noodzakelijk blijft bij gebruik van de nieuwe methode.

Hoofdstuk 7 beschrijft een programma, genaamd Neuranet, dat speciaal is ontwikkeld voor het kwantificeren van de samenstelling van urinewegstenen aan de hand van infrarood spectra. Deze spectra moeten gemeten zijn in het midden-infrarood gebied van 4000–400 cm^{-1} . Het programma is uitgerust met een aantal gereedschappen, zoals library search en een neurale netwerk. Daarnaast bevat het programma een faciliteit waarmee de gebruiker een aantal expert regels kan definiëren om de nauwkeurigheid van de netwerkuitkomsten te verbeteren. Het gebruikte netwerk bestaat uit drie lagen en is gebaseerd op het zogenaamde ‘back-propagatie’ principe. Het netwerk model kan in een urinewegsteen de relatieve samenstelling bepalen van maximaal tien componenten. Het hoofdstuk bevat naast een algemene beschrijving van het programma ook voorbeelden van het vaststellen van de samenstelling van een aantal van patiënten afkomstige urinewegstenen. Daarnaast bevat het hoofdstuk enkele appendices die de specificaties van het programma beschrijven, zoals de ontwikkeling van een Neuranet methode (b.v. netwerk training) en een syntax beschrijving van de expertregels.